

XÂY DỰNG BỘ CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD VÀ ISJ ĐỂ XÁC ĐỊNH ĐỘ ĐA HÌNH VÀ TẦN SỐ ĐỘT BIẾN Ở NGÔ

Trần Thị Thúy¹, Đậu Thị Ngọc Nga¹, Nguyễn Thị Loan¹,
Bùi Hồng Ngọc¹, Trần Hồng Quân¹, Trần Thị Ngọc Diệp¹,
Trần Đăng Khánh¹, Khuất Hữu Trung¹, Vi Lạng Sơn¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã sử dụng chỉ thị phân tử RAPD và ISJ để đánh giá và xác định tần số đột biến của quần thể ở ngô được tạo ra từ gây đột biến hạt phấn với hóa chất EMS. Kết quả sử dụng 50 mỗi RAPD và 2 mỗi ISJ với DNA của giống ngô ML10 (giống nền sử dụng để tạo quần thể đột biến) đã xác định được 10 mỗi đa hình từ 3 - 4 băng. Trong 10 mỗi sử dụng, có 5 mỗi chạy ổn định và lặp lại tốt giữa 186 mẫu DNA được tách từ 186 cá thể M1 từ quần thể đột biến. Tần số đột biến trung bình cho cả 5 mỗi là 1/34,3 kb. Nghiên cứu này là bước đầu tiên đánh giá chất lượng quần thể đột biến bằng chỉ thị phân tử. Kết quả mở đường cho các nghiên cứu khác như sàng lọc kiểu hình, giải mã hệ genome, để đánh giá sâu hơn quần thể đột biến EMS ở ngô ML10 làm cơ sở cho nghiên cứu cơ bản chức năng gene và chọn giống.

Từ khóa: RAPD, ISJ, tần số đột biến

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây ngô là một cây trồng có ý nghĩa quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Vì vậy, có rất nhiều các nghiên cứu trên thế giới sử dụng cây ngô làm cây mô hình nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Rất nhiều gene ở ngô đã được làm sáng tỏ chức năng dựa vào việc tìm và nghiên cứu các biến dị tự nhiên/nhân tạo. Phần lớn các đột biến nhân tạo trên ngô được tạo ra bằng hai cách: dùng EMS xử lí hạt phấn, hoặc lai với dòng có transposon đang có khả năng “nhảy” (transpose) mạnh (Candela and Hake, 2008). Gerald Neuffer đã tạo ra rất nhiều đột biến được sử dụng bởi các nhà khoa học trên thế giới cho đến nay (Neuffer, 1994). Để đánh giá chất lượng của một quần thể đột biến, người ta có thể dựa vào tần số tìm thấy các đột biến kiểu hình khác dạng so với dòng gốc. Đánh giá này dễ dàng và trực quan nhưng lại không thể phát hiện các đột biến điểm không gây ra kiểu hình. Vì vậy người ta sẽ kết hợp với phương pháp dùng chỉ thị phân tử để kiểm tra ước tính tần số đột biến.

Mỗi RAPD (random amplified polymorphic DNA) là những đoạn nucleotide (oligonucleotide) 10bp có thể bám vào DNA khuôn và nhân lên sản phẩm PCR. Sự xuất hiện thêm băng mới hay mất đi một băng là kết quả của việc vị trí bám mỗi trên DNA khuôn bị thay đổi ít nhất 1 bp hoặc hơn. Trong trường hợp gây đột biến bằng EMS, phần lớn sự thay đổi là đột biến điểm (thay 1 nucleotide). Chen và cộng tác viên (2012) đã sử dụng RAPD để ước tính tần số đột biến trên quần thể đột biến lúa mì bằng

EMS. Mỗi ISJ (Intron-exon Spliced Junction) là loại mỗi được thiết kế dựa trên trình tự bảo thủ của nơi tiếp giáp và cắt giữa intron và exon theo Weining và cộng tác viên (1991); Zeng và cộng tác viên (2010). Mỗi ISJ thường có 15 nucleotit và vì thế nhiệt độ nóng chảy T_m của mỗi này thường cao hơn (T_m khoảng 46°C) mỗi RAPD (10 bp T_m khoảng 31°C). Vì vậy, khả năng lặp lại của phản ứng PCR tốt hơn mỗi RAPD. Cách tính tần số đột biến với mỗi ISJ giống với mỗi RAPD.

Bằng xử lí hạt phấn với EMS trên dòng ngô nội thuần chủng ML10, chúng tôi đã tạo được quần thể đột biến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chuẩn hóa điều kiện PCR và sàng lọc các mỗi RAPD chạy ổn định ở dòng ngô ML10, từ đó xác định được tần số đột biến của quần thể đột biến EMS trên giống ngô ML10.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Dòng mẹ ML10 của giống lai đơn LVN10 được lựa chọn để xử lí đột biến. Giống ngô lai đơn LVN10 có nguồn gốc của Viện Nghiên cứu Ngô, được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật tháng 8 năm 1994. Mặc dù đã được tạo ra cách đây 25 năm nhưng hiện giống LVN10 vẫn là giống được nhiều hộ nông dân chọn lựa vì năng suất cao và khả năng thích ứng với mọi vùng sinh thái trong cả nước.

- Các mỗi RAPD và ISJ.

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

Bảng 1. Danh sách các môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự môi (5' - 3')	STT	Tên môi	Trình tự môi (5' - 3')	STT	Tên môi	Trình tự môi (5' - 3')
1	OPO01	GGC ACG TAA	18	OPO18	CTC GCT ATC	35	OPN15	CAG CGA CTG
2	OPO02	ACG TAG CGT	19	OPO19	GGT GCA CGT	36	OPN16	AAG CGA CCT
3	OPO03	CTG TTG CTA	20	OPO20	ACA CAC GCT	37	OPN17	CAT TGG GGA
4	OPO04	AAG TCC GCT	21	OPN01	CTC ACG TTG	38	OPN18	GGT GAG GTC
5	OPO05	CCC AGT CAC	22	OPN02	ACC AGG GGC	39	OPN19	GTC CGT ACT
6	OPO06	CCA CGG GAA	23	OPN03	GGT ACT CCC	40	OPN20	GGT GCT CCG
7	OPO07	CAG CAC TGA	24	OPN04	GAC CGA CCC	41	OPF01	ACG GAT CCT G
8	OPO08	CCT CCA GTG	25	OPN05	ACT GAA CGC	42	OPAA03	TTA GCG CCC C
9	OPO09	TCC CAC GCA	26	OPN06	GAG ACG CAC	43	OPAA04	AGG ACT GCT C
10	OPO10	TCA GAG CGC	27	OPN07	CAG CCC AGA	44	OPAB01	CCG TCG GTA G
11	OPO11	GAC AGG AGG	28	OPN08	ACC TCA GCT	45	OPAH03	GGT TAC TGC C
12	OPO12	CAG TGC TGT	29	OPN09	TGC CGG CTT	46	OPAJ01	ACG GGT CAG A
13	OPO13	GTC AGA GTC	30	OPN10	ACA ACT GGG	47	OPAJ05	CAG CGT TGC C
14	OPO14	AGC ATG GCT	31	OPN11	TCG CCG CAA	48	OPBA01	TTC CCC ACC C
15	OPO15	TGG CGT CCT	32	OPN12	CAC AGA CAC	49	OPBB01	ACA CTG GCT G
16	OPO16	TCG GCG GTT	33	OPN13	AGC GTC ACT	50	OPBB05	AACAGGGCCG
17	OPO17	GGC TTA TGC	34	OPN14	TCG TGC GGG			

Bảng 2. Danh sách các môi ISJ sử dụng trong nghiên cứu (trình tự môi thiết kế theo Weining và cộng tác viên, 1991).

STT	Tên môi	Trình tự môi (5'3')
1	E2	GGAATTCCA CGTCCA
2	R2	TGCTGGTTTGCA GGT

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý đột biến

Ngô được trồng hai vụ ở Hà Nội: vụ Xuân trồng vào tháng 2, vụ Mùa trồng vào tháng 8. Phương pháp gây đột biến được thực hiện theo (Neuffer (1994). Hạt phần ngô được thu thập mới vào buổi sáng trong túi bao cờ (cờ đã được bọc từ chiều hôm trước đó). Khoảng 1220 ml phần được ủ với 70 ml dầu Mineral oil (Sigma) chứa EMS (Sigma) ở nồng độ 0,05% trong 30 phút. Sau đó, dung dịch hạt phần trong dầu được nhỏ vào râu ngô. Các hạt ngô thu được từ bắp xử lý gọi là các hạt M1.

Trong nghiên cứu này sử dụng 186 cá thể M1 ngẫu nhiên từ quần thể đột biến từ dòng ML10.

2.2.2. Phương pháp PCR, điện di

- Mẫu lá được thu thập và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của (Doyle JJ và Doyl JL, 1990).

- Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cycler. Tổng thể tích phản ứng là 15 µl, bao gồm: Taq2X Mastermix (NEB): 7,5 µl; DNA khuôn: 3 µl; môi (5 µM): 3 µl, H₂O: 1,5 µL. Chu trình nhiệt: 95°C: 5 phút; sau đó lặp lại 40 chu kì: 95°C: 30 giây, 31°C (với mỗi RAPD) hoặc 46°C (với mỗi ISJ): 1 phút, 68°C: 2 phút và kết thúc bằng 68°C: 10 phút.

- Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. Gel được nhuộm ethidium bromide 0,5 mg/ml và soi trên máy Alpha Imager 1220 (Alpha Innotech, CA, USA).

- Công thức tính tần số đột biến dựa vào số nucleotide đã được sàng lọc nhờ chạy RAPD, ISJ như sau: Với mỗi môi RAPD có chiều dài là “n”, có số băng nhân lên ở dòng wild-type (chưa gây đột biến) là “X”, số băng mới xuất hiện thêm (hoặc bớt) là “Y”, và chạy kiểm tra “Z” cá thể. Tần số đột biến = Y/((nx2) × X × Z). Đơn vị 1/base pair (1/bp) theo Chen và cộng tác viên (2012).

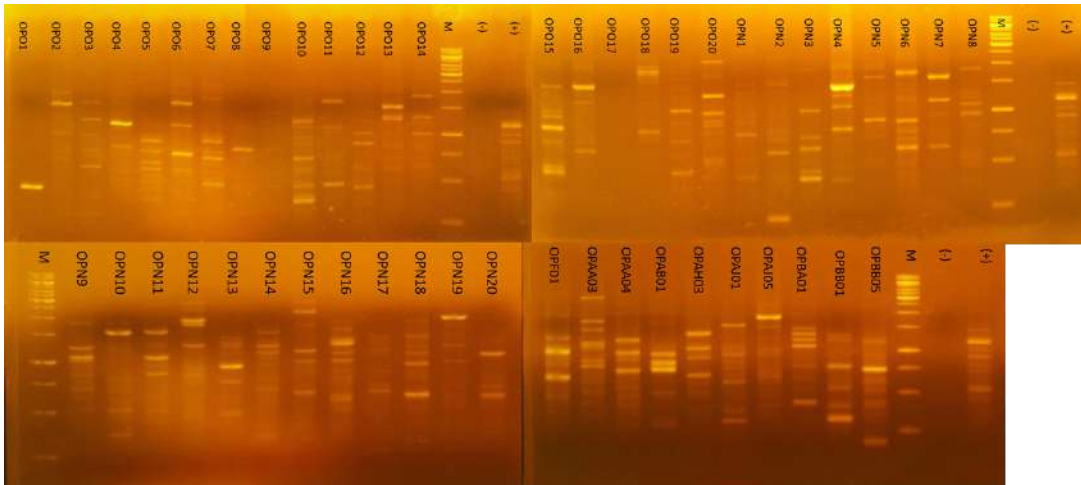
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2016 đến tháng 12/2018 tại Bộ môn Kỹ thuật Di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chuẩn hoá PCR mỗi RAPD và ISJ ở ngô

50 mỗi RAPD đã được sử dụng với DNA của giống ngô ML10 (giống nền sử dụng để tạo quần thể đột biến) và cho kết quả như hình 1.

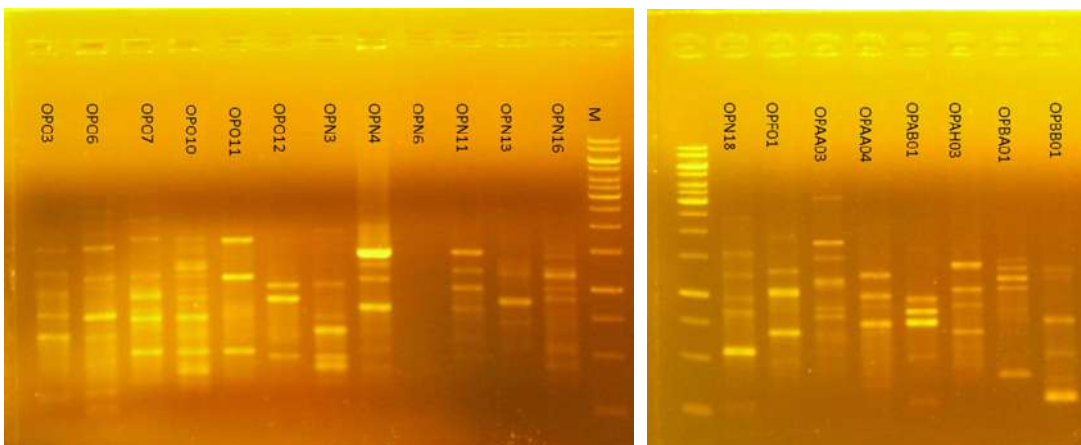


Hình 1. Kết quả chạy kiểm tra các môi RAPD cho mẫu ngô ML10

Ghi chú: M là thang DNA O'Generuler 1kb của Thermo; (-) là đối chứng âm (có môi OPN16) nhưng thay thế DNA khuôn bằng nước cất; (+) đối chứng dương: môi OPN16, DNA ML10.

Nhằm lựa chọn các môi có nhiều điểm bám để phục vụ kiểm tra được nhiều vị trí trong hệ gene của ngô, chúng tôi chọn những môi có lên từ ba băng trở lên để chạy lại và cho kết quả như hình 2. Các môi RAPD cho từ 3 băng trở lên và ổn định qua hai lần lặp lại là: OPO3, OPO6, OPO7, OPO10, OPO11, OPO12, OPN3, OPN4, OPN11, OPN13, OPN16, OPN18, OPF01, OPAA03, OPAA04, OPAB01,

OPAH03, OPBA01, OPBB01 (Hình 2). Trong số các môi RAPD chạy ổn định này, các môi có số băng rõ và có từ 4 băng trở lên là tám môi: OPN4, OPN11, OPN16, OPN18, OPAA03, OPAB01, OPBA01, OPAH03. Hai môi ISJ chạy khá ổn định là E2 và R2. Chúng tôi sẽ ưu tiên sử dụng 10 môi này trước để sàng lọc quần thể đột biến.



Hình 2. Kết quả chạy lặp lại các môi RAPD với DNA của giống ngô ML10

Ghi chú: M (1) thang DNA O'Generuler 1kb của Thermo.

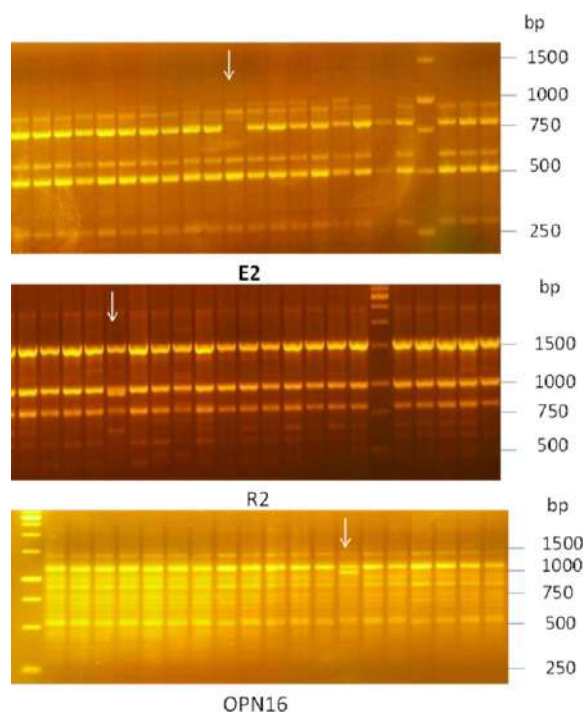
3.2. Xác định tần số đột biến bằng chỉ thị phân tử RAPD và ISJ

3.2.1. Tần số đột biến trên dòng ML10

Trong 10 môi sử dụng, xác định được 5 môi chạy ổn định và lặp lại tốt trên 186 mẫu cá thể M1 từ

quần thể đột biến. Các môi khác phản ứng PCR lên kém hoặc không có độ lặp lại ổn định giữa các mẫu DNA nên chúng tôi không sử dụng kết quả để tính tần số đột biến. Kết quả được tóm tắt trong bảng 2 và hình 3. Chúng tôi chỉ sử dụng các băng nào rõ, lặp lại được ở các mẫu chạy để tính tần số đột biến.

Ví dụ: mỗi R2 có thêm một số băng kích thước từ 500 - 700 bp nhưng không rõ và không lặp lại được ở tất cả các mẫu nên chúng tôi chỉ tính là có 3 băng rõ ở đối chứng (Hình 3). Kết quả bảng 2 cho thấy chỉ có 3 môi (OPN16, E2, R2) chúng tôi phát hiện được cá thể có băng đột biến, hai môi OPN18, OPAH03 không xuất hiện cá thể đột biến. Mỗi OPN16, E2, R2 đều xuất hiện 1 vị trí đột biến (1 cá thể/186 cá thể kiểm tra). Tần số đột biến của 3 môi OPN16, E2, R2 lần lượt là 1/26,7 kb; 1/27,9 kb; 1/16,7 kb. Như vậy, tính chung cho cả 5 môi (tổng số đột biến (3)/tổng số nucleotide đã sàng lọc từ cả 5 môi (103 kb): tần số đột biến là 1/34,3 kb. Lu và cộng tác viên (2018) dùng EMS đột biến hạt phần trên giống ngô B73, sau đó đã giải mã exon (exon capture) các dòng M1, từ đó tính trung bình 4585 đột biến trên một dòng M1. Với hệ genome ngô là 2,300,000 kb, tần số đột biến của quần thể trong nghiên cứu bởi Lu và cộng tác viên (2018) là 1/500 kb. Tuy nhiên, đây là dựa trên giải mã chỉ đoạn exon chứ không phải genomic nên tần số đột biến của Lu và các cộng tác viên (2018) trên cả hệ genome có thể cao hơn.



Hình 3. Hình ảnh chạy điện di sản phẩm PCR có xuất hiện băng đột biến của các môi E2, R2 và OPN16

Ghi chú: Mùi tên chỉ mẫu có số băng thêm/bớt do đột biến.

Bảng 2. Kết quả xác định tần số đột biến bằng chỉ thị phân tử

Tên môi	Trình tự (5'-3')	Số Nu của môi (n)	Số băng PCR rõ ở đối chứng (X)	Số băng thêm/bớt xuất hiện (Y)	Số cá thể kiểm tra (Z)	Tần số đột biến (F)
OPN16	AAGCGACCT	9	8	1	186	1/26,7 kb
OPN18	GGTGAGGTC	9	5	0	186	0/16,7 kb
OPAH03	GGTTACTGCC	10	4	0	186	0/14,9 kb
E2	GGAATTCCA CGTCCA	15	5	1	186	1/27,9 kb
R2	TGCTGGTTTGCA GGT	15	3	1	186	1/16,7 kb

Ở các loài khác sử dụng các phương pháp đột biến khác cho ra các tần số đột biến khác nhau. Theo nghiên cứu của Chen và cộng tác viên (2012), sử dụng phân tích các đoạn môi RAPD và ISJ phát hiện tần số đột biến trong lúa mì là 1/34 kb, Uauy và cộng tác viên (2009) - là 1/49,4 kb và Parry và cộng tác viên (2009) - là 1/49 kb. Những mật độ đột biến cao hơn trong lúa mì sử dụng cùng nồng độ EMS như Slade và cộng tác viên (2005) là 1/24 kb và Dong và cộng tác viên (2009) - là 1/30 kb. Có nhiều các yếu tố có thể ảnh hưởng đến tần số đột biến, chẳng hạn như nồng độ đột biến, thời gian tiếp xúc, tác động môi trường và kiểu gen của loài mục tiêu (Song và Henry, 1995).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Tầm soát và xây dựng bộ chỉ thị bao gồm 50 chỉ thị RAPD và 2 chỉ thị ISJ. Chọn được mười môi chạy ổn định và băng rõ nét trên giống ngô nội ML10 là OPN4, OPN11, OPN16, OPN18, OPAA03, OPAB01, OPBA01, OPAH03, E2 và R2.

Kết quả chạy 3 chỉ thị phân tử RAPD (OPN16, OPN18 và OPAH03) và 2 chỉ thị ISJ (E2, R2) trên 186 cá thể của quần thể đột biến cho thấy tần số đột biến trung bình là 1/34,3 kb.

4.2. Đề nghị

Ứng dụng bộ chỉ thị RAPD để sàng lọc nền di truyền cho chọn giống, để kiểm tra đa hình quần thể.

Để bổ sung làm rõ cho kết quả này, chúng tôi sẽ tiến hành giải mã trình tự cả hệ gene của một số cá thể đột biến để xác định cụ thể có bao nhiêu đột biến trong một cá thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Candela H, Hake S.**, 2008. The art and design of genetic screens: maize. *Nature reviews Genetics*, 9: 192-203.
- Chen L, Huang L, Min D, Phillips A, Wang S, Madgwick PJ, Parry MA, Hu YG.**, 2012. Development and Characterization of a New TILLING Population of Common Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE*, 7 (7): e41570.doi:10.1371/journal.pone.0041570.
- Dong C, Dalton-Morgan J, Vincent K, Sharp P.**, 2009. A Modified TILLING Method for Wheat Breeding. *Plant Gen.*, 2: 39-47.
- Doyle JJ, Doyle JL**, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Lu, X., Liu, J., Ren, W., Yang, Q., Chai, Z., Chen, R., Wang, L., Zhao, J., Lang, Z., Wang, H., Fan, Y., Zhao, J. and Zhang, C.**, 2018. Gene-Indexed Mutations in Maize. *Molecular Plant*, 11(3), pp. 496-504.
- Neuffer M.G.**, 1994. *Mutagenesis*. In: Freeling M., Walbot V. (eds) *The Maize Handbook*. Springer Lab Manuals. Springer, New York, NY, pp 212-219.
- Parry MA, Madgwick PJ, Bayon C, Tearall K, Hernandez-Lopez A, Baudo M, Rakszegi M, Hamada W, Al-Yassin A, Ouabbou H, Labhilili M, Phillips AL**, 2009. Mutation discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2817-2825.
- Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D**, 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol*, 23: 75-81.
- Song W, Henry RJ**, 1995. Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42: 273-281.
- Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, Tran RK, Tsai H, B Steve, C Luca, D Jorge.**, 2009. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC plant Biology*, 9: 115.
- Weining S and Langridge P.**, 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics*, 82 (2): 209-216.
- Zeng X, Wang Y, Li W, Wang C, Liu X. and Ji W.**, 2010. Comparison of the genetic diversity between *Triticum aestivum* ssp. *tibetanum* Shao and Tibetan wheat landraces (*Triticum aestivum* L.) by using intron-splice junction primers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57 (8): 1141-1150.

Development of RAPD and ISJ markers for analyzing mutation rate in a Vietnamese maize EMS-induced mutant population

Tran Thi Thuy, Dau Thi Ngoc Nga, Nguyen Thi Loan,
Bui Hong Ngoc, Tran Hong Quan, Tran Thi Ngoc Diep,
Tran Dang Khanh, Khuat Huu Trung, Vi Lang Son

Abstract

EMS-induced pollen mutagenesis have been used to create a mutant population in a Vietnamese inbred ML10. RAPD and ISJ molecular markers were used to evaluate the mutation frequency of Vietnamese maize EMS-induced mutant population. Fifty RAPD and two ISJ markers were used to screen ML10 for robust markers that amplified consistently more than 3 bands across tested samples. Ten such markers were identified and were used to screen a subset population of 186 random individuals M1 plants. The average mutation frequency was estimated to be 1/34.3 kb. These results are the first step to show that the mutagenesis was effective allowing other methods such as phenotyping and genome sequencing for further evaluation of EMS population in the ML10.

Keywords: RAPD, ISJ, Mutation frequency, maize mutagenesis, EMS

Ngày nhận bài: 15/12/2019

Ngày phản biện: 9/01/2020

Người phản biện: TS. Vũ Thị Thu Hiền

Ngày duyệt đăng: 13/01/2020